

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-343384
(P2001-343384A)

(43) 公開日 平成13年12月14日 (2001. 12. 14)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テームト [*] (参考) |
|-------------------------------------|-------|----------------|------------------------|
| G 0 1 N 33/53 | | C 0 1 N 33/53 | M 4 B 0 2 4 |
| C 1 2 N 15/09 | | C 1 2 Q 1/68 | A 4 B 0 6 3 |
| C 1 2 Q 1/68 | | C 0 1 N 33/566 | |
| G 0 1 N 33/566 | | 37/00 | 1 0 2 |
| 37/00 | 1 0 2 | C 1 2 N 15/00 | A |
| 審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 5 頁) 最終頁に続く | | | |

(21) 出願番号 特願2000-166710(P2000-166710)

(22) 出願日 平成12年6月2日(2000. 6. 2)

(71) 出願人 000230467

日本レーザ電子株式会社
名古屋市熱田区三本松町20番9号

(72) 発明者 米田 英克

名古屋市熱田区三本松町20番9号 日本レ
ーザ電子株式会社内

(72) 発明者 佐藤 高遠

名古屋市熱田区三本松町20番9号 日本レ
ーザ電子株式会社内

(74) 代理人 100081466

弁理士 伊藤 研一

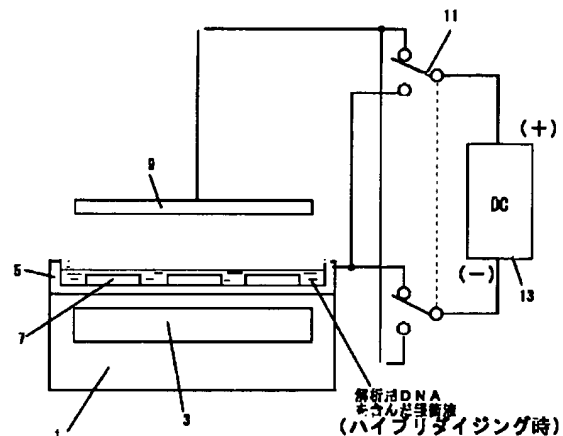
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 試料チップのハイブリダイジング方法及びディハイブリダイジング方法

(57) 【要約】

【課題】 DNAプローブと解析用DNAとを短時間にハイブリダイズ及びディハイブリダイズして遺伝子発現態様の解析を効率的に行うことができる試料チップのハイブリダイジング方法及びディハイブリダイジング方法を提供する。低濃度の解析用DNAを使用して解析作業を高精度に行うことができると共に解析コストを低減することができる試料チップのハイブリダイジング方法及びディハイブリダイジング方法を提供する。

【解決手段】 試料チップに微小間隔において配列固定された多数の試料プローブに対して解析用試料をハイブリダイズする。その際、第1電極上にセットされた試料チップを加熱した状態で第1電極及び該第1電極に対して所定の間隔において相対配置される第2電極間に電圧を印加して第1電極上にセットされた試料チップの試料プローブを(+)電荷に帯電させると共に両者間の解析用試料を(-)電荷に帯電させて解析用試料を試料プローブに誘電吸着させる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】試料チップに微小間隔において配列固定された多数の試料プローブに対して解析用試料をハイブリダイズする際に、第1電極上にセットされた試料チップを加熱した状態で第1電極及び該第1電極に対して所定の間隔において相対配置される第2電極間に電圧を印加して第1電極上にセットされた試料チップの試料プローブを(+)電荷に帯電させると共に両者間の解析用試料を(-)電荷に帯電させて解析用試料を試料プローブに誘電吸着させる試料チップのハイブリダイジング方法。

【請求項2】試料チップに微小間隔において配列固定された多数の試料プローブにハイブリダイズされた解析用試料をディハイブリダイズする際に、第1電極上にセットされた試料チップを加熱した状態で第1電極及び該第1電極に対して所定の間隔において相対配置される第2電極間に電圧を印加して第1電極上にセットされた試料チップの試料プローブ及びハイブリダイズされた解析用試料を(-)電荷に帯電させて(-)電荷に帯電した解析用試料を第2電極側へ誘電解離させる試料チップのディハイブリダイジング方法。

【請求項3】請求項1又は2において、試料プローブはDNAプローブ又はRNAプローブとした試料チップのハイブリダイジング方法及びディハイブリダイジング方法。

【請求項4】請求項1、2又は3において、解析用試料は蛍光物質、放射物質又は磁性物質により標識された試料チップのハイブリダイジング方法及びディハイブリダイジング方法

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】この発明は、ガラス基板上に配列されたDNAプローブやRNAプローブ等の試料プローブ(以下、DNAプローブという)に対して解析用DNAや解析用RNA等の解析用試料(以下、解析用DNAという)を掛け合わせ(hybridize)たり、DNAプローブに掛け合わされた解析用DNAを解離(Dehybridize)させるDNAのハイブリダイジング及びディハイブリダイジング方法に関する。

【0002】

【発明が解決しようとする課題】例えば細胞や組織の遺伝子発現様様(遺伝子発現量や遺伝子欠損等の変異)を解析する際に、例えばガラス基板上に数千個～数万個/cm²の密度でDNAプローブがドット配列されたマイクロチップやDNAチップ(以下、これらをDNAチップとする)を使用し、該DNAチップに配列されたDNAプローブに対し、解析しようとする細胞や組織から抽出して調整され、ラジオアイソトープや蛍光物質により標識された解析用DNAを付着させる。そしてDNA自体、相補関係からなるため、DNAプローブと解析用DNAが同一種の場合には互いに結合し合い、反対に異なる

場合には非結合になる。

【0003】しかしながら、DNAは螺旋構造であるため、DNAプローブと解析用DNAとが自然に結合し合うのに長時間(約6～12時間)かかるため、多数の遺伝子に関する遺伝子発現様様を短時間で効率的に行えない問題を有している。このため、例えば病理細胞を特定したり、病気に対して有効な薬を特定するのに多大な時間がかかり、適切な治療等ができない問題を生じている。

【0004】また、DNAプローブに対して解析用DNAを効率的に掛け合わせるには高濃度の解析用DNA溶液を使用する必要があるが、解析用DNA自体、少量しか採取できず、また高コストなため、解析作業を効率的で、かつ低コストに行えなかった。

【0005】本発明は、上記した従来の欠点を解決するために発明されたものであり、その課題とする処は、DNAプローブと解析用DNAとを短時間にハイブリダイズ及びディハイブリダイズして遺伝子発現様様の解析を効率的に行うことができる試料チップのハイブリダイジング方法及びディハイブリダイジング方法を提供することにある。

【0006】また、本発明の他の課題は、低濃度の解析用DNAを使用して解析作業を高精度に行うことができると共に解析コストを低減することができる試料チップのハイブリダイジング方法及びディハイブリダイジング方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明の請求項1は、試料チップに微小間隔において配列固定された多数の試料プローブに対して解析用試料をハイブリダイズする際に、第1電極上にセットされた試料チップを加熱した状態で第1電極及び該第1電極に対して所定の間隔において相対配置される第2電極間に電圧を印加して第1電極上にセットされた試料チップの試料プローブを(+)電荷に帯電させると共に両者間の解析用試料を(-)電荷に帯電させて解析用試料を試料プローブに誘電吸着させる。

【0008】また、請求項2は、試料チップに微小間隔において配列固定された多数の試料プローブにハイブリダイズされた解析用試料をディハイブリダイズする際に、第1電極上にセットされた試料チップを加熱した状態で第1電極及び該第1電極に対して所定の間隔において相対配置される第2電極間に電圧を印加して第1電極上にセットされた試料チップの試料プローブ及びハイブリダイズされた解析用試料を(-)電荷に帯電させて(-)電荷に帯電した解析用試料を第2電極側へ誘電解離させる。

【0009】

【発明の実施形態】以下、本発明方法を図に従って説明する。先ず、本発明方法を具体化する装置例を説明する

と、図1においてテーブル1には電熱ヒータ、ベルチエ素子等の加熱部材3が内蔵され、該テーブル1上には第1電極板5が取り付けられる。そして第1電極板5上には適宜個数のDNAチップ7が載置され、加熱部材3により電極板5を、後述する所定の温度に加熱させる。

【0010】一方、第1電極板5の上方には第2電極板9が、第1電極板5に対して所定の間隔、例えば2～200mm程度の間隔をおいて相対配置される。第1電極板5及び第2電極板9の間隔は後述する両電極間に印加される電圧に応じて調整される。第1及び第2電極5・9間の間隔は誘電体を構成し、空気層或いは絶縁材料であればよい。

【0011】第1電極板5及び第2電極板9は2回路3接点構造の切換スイッチ11を介して直流電源13に接続され、切換スイッチ11の切換操作により第1電極板5及び第2電極板9を(+)及び(-)に切換える。

【0012】DNAチップ7は、図2に示すようにスライドガラス等のガラス基板7a上に、例えば200μmの間隔をおいて多数のDNAプローブ7bが数千個～数万個/cm²の密度でドット状に配列固定されている。該DNAチップ7は細胞や組織毎にDNAプローブが固定された多種類の物が用意される。

【0013】そして解析しようとするDNAの種類に応じた単一或いは複数のDNAチップ7を第1電極板5上に並べた後、第1電極板5内に解析しようとする細胞や組織から抽出して調整され、ラジオアイソトープや蛍光物質により標識された解析用DNAを含有した緩衝液を満たしてDNAプローブ7bに付着可能にさせる。なお、緩衝液の液面は第2電極9に対して非接触でなければならない。

【0014】次に、上記状態にて加熱部材3を発熱制御してDNAプローブ7bと解析用DNAを含んだ緩衝液を約50～80℃、好適例としては約65℃に加熱した状態で切換スイッチ11により第1電極板5が(+)に、また第2電極板9が(-)になるように切換えて第1電極板5及び第2電極板9間に所定の電圧を印加すると、DNAプローブ7bを(+)電荷に、また解析用DNAを(-)電荷に誘電させる。

【0015】第1電極板5及び第2電極板9間に印加される電圧は、第1電極板5及び第2電極板9の間隔や両者間の誘電率等により適宜設定調整され、例えば第1電極板5及び第2電極板9の間隔が約2～5mmの場合には印加電圧を約2～5V、間隔が約200mmの場合には印加される電圧を約200～300Vに設定する。両者間の間隔が広い場合であっても両者間の誘電率が高い場合には印加電圧を低くすることができる。

【0016】第1電極板5内の緩衝液中に含まれる解析用DNAは螺旋構造であるが、約65℃に加熱されることにより螺旋状態から直状に変成してDNAプローブ7bに結合し易くなる。

【0017】そして解析用DNAの多くが加熱によりほぼ直状に変成した状態で第1電極板5及び第2電極板9間に所定の電圧が印加されると、上記したように第1電極板5上にセットされて(+)電荷に帯電したDNAチップ7の各DNAプローブ7bに対し、(-)電荷に帯電した解析用DNAが引き寄せられて吸着される。

【0018】そしてDNAプローブ7bと解析用DNAが同一の場合には誘電吸着したDNAプローブ7bと解析用DNAとがハイブリダイズし、反対に異なる場合にはDNAプローブ7bと解析用DNAとが非結合に保たれる。

【0019】上記した加熱及び電圧印加状態によるDNAプローブ7bと解析用DNAとのハイブリダイジング時間は、図3に示すように誘電率を一定とした場合には第1電極板5及び第2電極板9間に印加される電圧を、DNAプローブ7bと解析用DNAとが秒単位或いは分単位でハイブリダイズするように調整すればよい。

【0020】上記作業後、第1電極板5上から取り出したDNAチップ7に対して緩衝液を作用させてDNAプローブ7bに対して非結合の解析用DNAを除去した後、DNAチップ7の表面に対して光を照射してハイブリダイズされた解析用DNAに標識された蛍光物質を発光させることによりハイブリダイズされたDNAプローブ7bから解析用DNAを特定する。

【0021】次に、ディハイブリダイジングの方法を説明する。DNAプローブ7bにハイブリダイズされた解析用DNAの検出が終了したDNAチップ7を、緩衝液(ディハイブリダイジング時には緩衝液中に解析用DNAは含まれていない)が溜められた第1電極板5上にセットした後、加熱部材3を加熱制御してハイブリダイズしたDNAプローブ7b及び解析用DNAを約80～100℃、好適例としては約95℃に加熱させる。これによりガラス基板7a及びハイブリダイズした解析用DNAを二本鎖から一本鎖へ変成させる。

【0022】上記加熱状態にて切換スイッチ11を、第1電極板5が(-)、第2電極板9が(+)になるように切換操作して両者間に所定の電圧を印加すると、DNAプローブ7b及び解析用DNAを(-)電荷に帯電させる。このとき、DNAプローブ7bはガラス基板7aに固定されているため、加熱により一本鎖に変成し、(-)電荷に帯電した解析用DNAが第2電極9側へ引き寄せられることによりDNAプローブ7bからディハイブリダイズされる。

【0023】本実施形態は、DNAプローブ7bを約55～70℃で加熱した状態でDNAプローブ7bを(+)電荷に帯電させると共に緩衝液中を浮遊する解析用DNAを(-)電荷に帯電させることによりDNAプローブ7bに解析用DNAを電気的に引き寄せて吸着させることによりハイブリダイズすることができ、ハイブリダイジング時間を秒単位或いは分単位に短縮すること

ができ、解析用DNAの検出時間を大幅に短縮して測定作業を効率的に行うことができる。

【0024】また、反対にDNAプローブ7bにハイブリダイズされた解析用DNAをディハイブリダイズする際にはDNAプローブ7bを約90～95℃に加熱してハイブリダイズしたDNAを日本鎖から一本鎖構造に変成させた状態で(－)電荷に帯電したDNAプローブ7b及び解析用DNAから解析用DNAのみを第2電極9側へ引き寄せることにより両者の結合を解除してディハイブリダイズさせることができ、そのディハイブリダイジング時間を大幅に短縮することができる。

【0025】更に、DNAプローブ7bを(＋)電荷に帯電させて解析用DNAを強制的に誘電吸着させるため、緩衝液に調整される解析用DNAの濃度を低くすることができ、微量量の解析用DNAであってもその解析作業を高精度に行うことができると共に解析コストを低減することができる。

【0026】上記説明は、第2電極9の表面を誘電材、例えば合成樹脂シート等で覆ったり、解析用DNAを浮遊させる緩衝液の液面を合成樹脂シートで覆うことにより、第1電極5との間隔が微小であっても解析用DNAを確実に誘電して(－)電荷に帯電させることができる。

【0027】上記説明は、解析用DNAを含んだ緩衝液中にDNAチップを浸漬した状態で加熱及び電界を作用させる方法としたが、この方法にあっては解析用DNAを含んだ緩衝液を大量に必要とする。これを回避するた

め、DNAチップの表面に解析用DNAを含んだ緩衝液を微少、滴下した後にDNAチップの表面にセットされるカバーガラスにより解析用DNAを含んだ緩衝液を全体に押し広げてよい。

【0028】上記説明は、ディハイブリダイジングにおいても第1電極内に溜められた緩衝液の液面と第2電極との間に空隙を設けて電界を作用させる方法としたが、この場合にあっては緩衝液中に第2電極を直接浸漬させてもよい。

【0029】

【発明の効果】本発明は、DNAプローブと解析用DNAとを短時間にハイブリダイズ及びディハイブリダイズして遺伝子発現態様の解析を効率的に行うことができる。また、低濃度の解析用DNAを使用して解析作業を高精度に行うことができると共に解析コストを低減することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】DNAのハイブリダイジング方法及びディハイブリダイジング方法を具体化する装置例を示す説明図である。

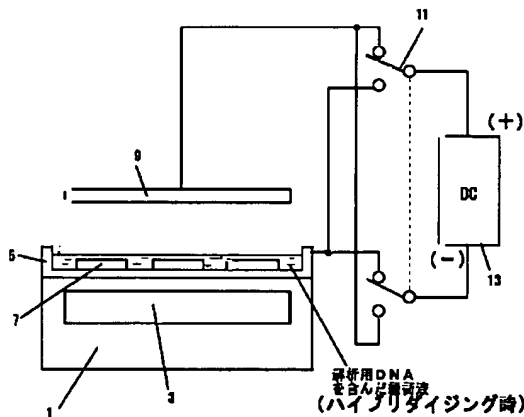
【図2】DNAチップの概略図である。

【図3】印加電圧とハイブリダイジング時間との関係を示すチャートである。

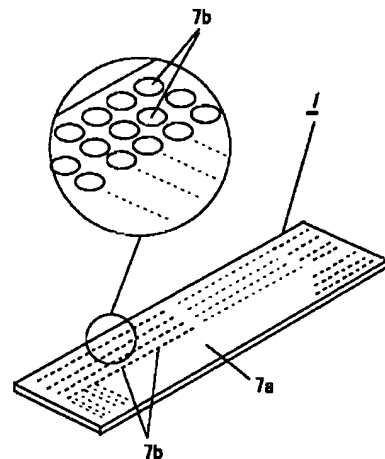
【符号の説明】

3－加熱部材、5－第1電極、7－DNAチップ、7a－ガラス基板、7b－DNAプローブ、9－第2電極、13－直流電源

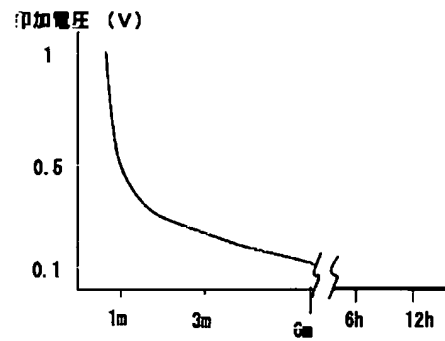
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷

識別記号

F I
C 1 2 N 15/00

(参考)

F

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 CA11
HA14 HA19
4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR32
QR35 QR56 QR84 QS03 QS34
QS39 QX02 QX07